

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790250
 研究課題名（和文） 関節疾患と時計遺伝子

研究課題名（英文） Joint disease and clock genes

研究代表者

宝田 剛志（TAKARADA TAKESHI）
 金沢大学・薬学系・助教
 研究者番号：30377428

研究成果の概要（和文）：本研究では、軟骨細胞に発現する時計遺伝子群（Bmal1, Clock あるいは Per1 等）の生理学的あるいは病態生理学的役割を解明した。Bmal1 欠損マウスや各種分子生物学的解析の結果、軟骨細胞では分化調節能を有する Ihh の発現が、Per1 をはじめとする時計遺伝子群によって直接的に転写制御され、骨の伸長過程が 24 時間周期にて制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the possible role of clock genes in mechanism underlying the regulation of chondrogenic differentiation processes. The results suggested that chondrogenic differentiation may be modulated by clock genes expressed by chondrocytes in association with the inhibition by Per1 of Bmal1/Clock-dependent indian hedgehog expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：時計遺伝子・軟骨細胞・骨関節組織・indian hedgehog

1. 研究開始当初の背景

軟骨細胞は、骨格の成長に関与する「成長板」や関節の維持を担う「関節軟骨」に主に存在する。成長板には異なる分化段階の軟骨細胞が存在するが、この分化過程は①増殖性

軟骨細胞、②前肥大軟骨細胞、さらに③肥大軟骨細胞へと規則的に進行し、この過程が正常に進行することにより、骨格の長軸方向への伸長が促進されると理解される。一方、関節軟骨に存在する軟骨細胞は、成長板に存在する軟骨細胞とは異なり、増殖能や分化能

を有さない事が知られており、これらの特徴が変形性関節症 (Osteoarthritis; OA) のような関節軟骨破壊性疾患が難治性を示す原因の一つとなっている。

一方、動物の睡眠・覚醒をはじめ、生物に広く認められる 24 時間周期のリズミクな生体機能 (概日リズム、サーカディアンリズム) は、「生物時計」により制御されている。生物時計の基本モデルは、①入力系、②振動体および③出力系から構成され、例えば、光の入力経路である網膜視床下部路が入力系にあたり、視交叉上核が振動体に、そして睡眠・覚醒、松果体からのメラトニン放出あるいは免疫系のリズム等が出力系と考えられる。時計遺伝子とは、このモデルの振動体を構成する必須因子であり、各種時計遺伝子 (Bmal1, Clock, Per, Cry, Dec など) の転写と翻訳を介する負のフィードバックループ機構の存在が明らかとなっている。つまり、視交叉上核に存在する 1 万個の神経細胞では、Bmal1 と Clock のヘテロダイマーが、各種遺伝子プロモーター上に存在する E-box 配列に結合して、他の時計遺伝子 Per, Cry, Dec 等の転写を促進するだけでなく、これらの遺伝子産物が Bmal1/Clock 複合体による自らの転写を抑制することが知られており、現在ではこのループ機構が生物時計における振動体の分子骨格とされている。

1998 年 Balsalobre らが、ラット由来培養繊維芽細胞を血清処理することにより各種時計遺伝子のすみやかな発現誘導が起こり、その発現が概日性を示す事実を報告した。これ以降、視交叉上核を振動体とする「中枢時計」の存在だけではなく、心臓、肺、肝臓および腎臓等の各種末梢組織における「末梢時計」の存在が注目され始めた。近年我々は、軟骨細胞に各種時計遺伝子が発現すること、および時計遺伝子の一種である Per1 の発現が副甲状腺刺激ホルモン (PTH) に応答性を示すこと、さらに軟骨組織が存在する脛骨では各種時計遺伝子の発現が概日リズムを示す事実を報告した。この結果を受けて、軟骨細胞に発現する生物時計振動体の出力系を検討する目的で、軟骨細胞株 ATDC5 細胞の Per1 安定発現株を樹立し、各種軟骨細胞分化マーカーの発現を検討したところ、indian hedgehog (Ihh) の発現が野生株と比較して有意に減少する事実を見出した。Ihh は、軟骨細胞分化過程における前肥大軟骨細胞に発現し、軟骨細胞の増殖促進効果および肥大化抑制効果を有する分泌蛋白質である。次いで、Ihh の時計遺伝子による発現制御機構を検討する目的で、Ihh のプロモーター領域を解析した結果、E-box 配列が 3 つ存在することが明らかとなり、実際に Ihh プロモーター領域を Luciferase レポーターベクターに導入し、HEK293 細胞を用いた Luciferase assay

法により検討すると、Bmal1 および Clock の導入により Luciferase 活性は著明に上昇し、この効果は Per1 の導入により有意に抑制されることが明らかとなった。つまり、軟骨細胞の規則的な分化過程に必須である Ihh の発現制御機構に、各種時計遺伝子が関与する可能性が示唆される

2. 研究の目的

本研究課題では、現在までの解析結果を踏まえて、Ihh の時計遺伝子による発現制御機構を明らかにすることをはじめ、各種時計遺伝子および Ihh を含む時計遺伝子制御下にある各種遺伝子産物の軟骨組織における概日性あるいは振動性を検討し、軟骨組織における生物時計のシステム理解を深める。また、関節軟骨破壊性疾患である OA の病態発症機序における各種時計遺伝子の関与の可能性を追求し、軟骨組織に発現する時計遺伝子の生理学的および病態生理学的な統合的理解の促進を目的とする。

3. 研究の方法

○初代培養軟骨細胞の培養

マウス生後 1-2 日齢の新生仔より無菌的に肋骨を摘出し、GPBS 中に浸した。その後 20mL の 0.25 % コラゲナーゼを含む DMEM に移し、37 °C、2 時間攪拌後、上清を吸引除去した。そこに温めた GPBS を加え、ピペッティングにより軟組織を解離し、除去した。その後 20 mL の 0.25 % コラゲナーゼを含む DMEM を加え、37 °C、3 時間攪拌後、細胞浮遊画分を細胞用フィルターでろ過し、ろ液を 250 g、5 分間遠心後、沈殿を、10 % FBS を含む DMEM で懸濁し、 2×10^4 cells/cm² の密度で各プレートに播種した。翌日、培地を交換し、この時点培養 0 日目とし、以後 2 日おきに培地を交換した。培養 2 日目から 50 · g/mL ascorbic acid を添加し、各日数培養した。

○リアルタイム PCR 法

逆転写反応で得られた cDNA を Real-time PCR に用いた。Real-time PCR 用チューブに iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) [100 mM KCl, pH 8.4 40 mM Tris-HCl, 0.4 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dTTP and dGTP), 50 units/ml iTaq DNA polymerase, 6 mM MgCl₂, 20 nM fluoresein SYBR Green 1, and stabilizers], cDNA および各種 primer をそれぞれ加えて Real-time PCR を行った。

○ChIP アッセイ法

DNA および核タンパク質のクロスリンクを行うため、細胞に Formaldehyde を添加した後、Handy Sonic (Tomy Seiko, Japan) を用いて、

超音波処理を行った。免疫沈降には anti-CLOCK 抗体を用い、ChIP Assay Kit (Upstate Biotechnology) を用いて ChIP Assay を行った。また、PCR 反応には Ihh プロモーター領域の 5' Flanking 領域を使用した。

○In situ hybridization 法

凍結切片を 4% paraformaldehyde で 20 分間固定した後、0.1 M phosphate buffer (PB) で 10 分間、3 回洗浄した。次いで 0.2 N HCl で 10 分間処理した後 PB で 10 分間、3 回洗浄した。その後 Proteinase K 溶液 (10 · g/mL ProK in PB) で 5 分間処理し、PB で 5 分間、3 回洗浄した。続いて 0.25% 無水酢酸/0.1 M Triethanolamine で 10 分間処理し、PB で 5 分間 1 回洗浄後、70% EtOH および 95% EtOH でそれぞれ 5 分間洗浄したのち、室温で 20 分間風乾した。

DIG 標識 cRNA プローブを Hybridization buffer [20 mM Tris-HCl (PH 7.5)、0.3 M NaCl、5xSSC、10% dextran sulfate、10% Denhardt's、50% de-ionized formamide、0.5 mg/mL yeast tRNA] に適当な濃度に希釈し、使用直前に 85°C で 10 分間熱変性させた後、急冷した。変性後のプローブを風乾させた切片に滴下し、2xSSC で湿らせた湿箱中に置き、65°C で一晩反応させた。翌日、切片を 4xSSC (65°C、20 分)、High stringency [2xSSC、50% de-ionized formamide] (65°C、30 分)、TNE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA (PH 8.0)、500 mM NaCl] (37°C、10 分 3 回)、RNaseA 溶液 (20 · g/mL RNaseA in TNE buffer) (37°C、30 分)、TNE buffer (37°C、10 分)、2xSSC ((65°C、30 分)、0.2xSSC ((65°C、20 分) を 2 回、Buffer 1 [100 mM Tris-HCl (PH 7.5)、150 mM NaCl] (室温、10 分)、Blocking reagent (1.5% blocking reagent in Buffer1) (室温、1 時間)、Buffer1 (室温、2 分) の順に反応させた。その後、0.5% blocking reagent で 500 倍希釈した alkaline phosphatase 標識抗 DIG 抗体と 4°C で 16 時間抗体反応させた。反応後の切片を Buffer1 (0.2% Tween) で、室温で 15 分間、4 回洗浄後、Buffer3 [100 mM Tris-HCl (PH 9.5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl₂] で室温 10 分間、反応させた後、Buffer3 で 50 倍に希釈した NBT/BCIP を切片上に滴下して、適当な発色が得られるまで室温で遮光して反応させた。発色後、Buffer3 で 3 分間洗浄し、80% グリセロールで封入した後、顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

[2008 年度]

初代培養軟骨細胞では、細胞成熟度にかかわらず各時計遺伝子の mRNA 発現が認められた。

また、Per1 を軟骨細胞株である ATDC5 細胞に安定発現させたところ、Alcian Blue の染色性の有意な低下とともに、軟骨細胞分化マーカーである II 型および X 型コラーゲン mRNA の有意な発現低下が観察された。Per1 安定発現細胞では Sox6 mRNA 発現が低下していることに加え、ATDC5 細胞を培養すると 14 日目まで経時的に Ihh mRNA 発現が上昇するのに対して、Per1 安定発現細胞ではこのような Ihh mRNA 発現上昇は観察されなかった。このことから、Per1 が軟骨細胞の分化過程に対して抑制的に作用するが Ihh や Sox6 遺伝子を介している可能性が示唆された。続いて、ATDC5 細胞に Bmal1 と Clock 両時計遺伝子を一過性に強制発現させたところ、Ihh mRNA 発現の著明な上昇が招来されたが、このときさらに Per1 遺伝子を共発現させると、Bmal1 と Clock による Ihh mRNA 発現上昇は消失した。さらに、ChIP assay を行ったところ、Ihh プロモーター上の E-box に CLOCK タンパクが結合する可能性が示された。時計遺伝子による Ihh 発現制御が示唆されたので、マウス肋軟骨成長板における遺伝子発現振動を解析したところ、Per1、Bmal1 および Ihh にリズム性の発現変動が観察された。本研究結果より、軟骨組織においては、PTH 誘導性の時計遺伝子 Per1 によって細胞の分化過程が制御されるが、これは軟骨分化調節能を有するサイトカインである Ihh の発現調節を介している可能性が示唆される。

[2009 年度]

時計遺伝子の関節組織における役割を in vivo で解析する目的で、Bmal1 ノックアウトマウスを入手し、軟骨細胞の分化成熟過程における時計遺伝子の役割を解析した。生後 1 日齢 Bmal1 欠損マウスの子仔より肋軟骨を摘出し、軟骨細胞の初代培養を行った。アスコルビン酸を添加することにより分化誘導を行い、培養 7、14 および 21 日目に各種解析を行った。軟骨細胞の成熟マーカーである Alcian blue 染色およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定を行った結果、Bmal1 欠損マウス由来軟骨細胞では、野生型マウス由来軟骨細胞と比較して、それらの染色性および活性が有意に低下していた。軟骨細胞は間葉系幹細胞から分化するが、Sox5、Sox6 および Sox9 はいずれも、静止軟骨細胞が増殖軟骨細胞に成熟するときに必須の転写因子であるのに対し、Ihh と Runx2 はともに増殖軟骨細胞から肥大化軟骨細胞への成熟を促進する因子である。これら軟骨細胞成熟を制御する遺伝子や、軟骨細胞の成熟前期マーカーである collagen II および後期マーカーである collagen X の mRNA 発現量を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、野生型マウス由来軟骨細胞と比較して、Bmal1 欠損マウス

ス由来軟骨細胞では、Ihh と collagenX の mRNA 発現が有意に低下していたのに対して、Sox5, Sox6, Sox9 および Runx2 の mRNA 発現には著明な変化は認められなかった。また、生後1日齢の Bmal1 欠損マウス、あるいは野生型マウスの新生仔より脛骨を摘出し、固定、脱灰および脱水後、凍結切片を作成し、in situ hybridization により各種軟骨細胞成熟関連遺伝子の mRNA 発現を解析した。その結果、Ihh と ALP の mRNA 発現量が Bmal1 欠損マウスの脛骨において有意に低下していた。本研究結果より、Bmal1 欠損マウスにおいては Ihh の mRNA 発現量が減少し、軟骨細胞の成熟化が抑制されている可能性が示唆される。したがって in vivo においても、軟骨細胞の成熟を促進する Ihh の発現が、Ihh の上流に存在する E-box 配列を介し、時計遺伝子により制御されている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- [1] Yuki Kambe, Noritaka Nakamichi, Takeshi Takarada, Ryo Fukumori and Yukio Yoneda (2010) Induced tolerance to glutamate neurotoxicity through downregulation of NR2 subunits of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured rat striatal neurons. *J. Neurosci. Res.* in press. 査読有
- [2] Noritaka Nakamichi*, Ryo Fukumori*, Takeshi Takarada, Yuki Kambe, Tomomi Yamamoto, Nobuyuki Matsushima, Nobuaki Moriguchi and Yukio Yoneda (2010) Preferential inhibition by antidiarrheic 2-methoxy-4-methylphenol of Ca²⁺ influx across acquired N-methyl-D-aspartate receptor channels composed of NR1/NR2B subunit assembly. *J. Neurosci. Res.* in press. *Equally contributed. 査読有
- [3] Ryo Fukumori*, Noritaka Nakamichi*, Takeshi Takarada, Yuki Kambe, Nobuyuki Matsushima, Nobuaki Moriguchi and Yukio Yoneda (2010) Inhibition by 2-methoxy-4-ethylphenol of Ca²⁺ influx through acquired and native N-methyl-D-aspartate receptor channels. *J. Pharmacol. Sci.* 112: 273-281. *Equal contribution. 査読有
- [4] Takeshi Takarada*, Keisuke Tamaki*, Toru Takumi, Masato Ogura, Yuma Ito, Noritaka Nakamichi and Yukio Yoneda (2009) A protein-protein interaction of stress-responsive myosin VI endowed to inhibit neural progenitor self-replication with RNA binding protein, TLS, in murine hippocampus. *J Neurochem* 110:1457-1468. *Equally contributed. 査読有
- [5] Takeshi Takarada, Hironori Hojo, Mika Iemata, Koichi Sahara, Ayumi Kodama, Nobuhiro Nakamura, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2009) Interference by adrenaline with chondrogenic differentiation through suppression of gene transactivation mediated by Sox9 family members. *Bone* 45: 568-578. 査読有
- [6] Takeshi Takarada, Yoshifumi Takahata, Mika Iemata, Eiichi Hinoi, Kyosuke Uno, Takao Hirai, Tomomi Yamamoto and Yukio Yoneda (2009) Interference with cellular differentiation by D-serine through antagonism at N-methyl-D-aspartate receptors composed of NR1 and NR3A subunits in chondrocytes. *J Cell Physiol* 220, 756-764. 査読有
- [7] Noritaka Nakamichi, Yukichi Ishioka, Takao Hirai, Shusuke Ozawa, Masaki Tachibana, Nobuhiro Nakamura, Takeshi Takarada and Yukio Yoneda (2009) Possible promotion of neuronal differentiation in fetal rat brain neural progenitor cells after sustained exposure to static magnetism. *J Neurosci Res* 87, 2406-2417. 査読有
- [8] Yukari Nakamura*, Takeshi Takarada*, Ayumi Kodama, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2009) Predominant promotion by tacrolimus of chondrogenic differentiation to proliferating chondrocytes. *J Pharmacol Sci* 109, 413-423. *Equally contributed. 査読有
- [9] Takeshi Takarada and Yukio Yoneda (2009) Transactivation by runt related factor-2 of matrix metalloproteinase-13 in astrocytes. *Neurosci Lett* 451, 99-104. 査読有
- [10] Bin Gu*, Noritaka Nakamichi*, Wen-Sheng Zhang, Yukary Nakamura, Yuki Kambe, Ryo Fukumori, Kazuhiro Takuma, Kiyofumi Yamada, Takeshi Takarada, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2009) Possible protection by notoginsenoside R1 against neurotoxicity of

N-methyl-D-aspartate receptor composed of an NR1/NR2B heteromeric assembly. *J Neurosci Res* 87, 2145-2156. *Equally contributed. 査読有

- [11] Yoshifumi Takahata*, **Takeshi Takarada***, Mika Iemata, Tomomi Yamamoto, Yukary Nakamura, Ayumi Kodama and Yukio Yoneda (2008) Functional expression of beta2 adrenergic receptors responsible for protection against oxidative stress through promotion of glutathione synthesis after Nrf2 upregulation in undifferentiated mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *J Cell Physiol* 218, 268-275. *Equally contributed. 査読有
- [12] Danko D. Georgiev, Hideo Taniura, Yuki Kambe, **Takeshi Takarada** and Yukio Yoneda (2008) A critical importance of polyamine site in NMDA receptors for neurite outgrowth and fasciculation at early stages of P19 neuronal differentiation. *Exp Cell Res* 314, 2603-2617. 査読有
- [13] Yoshifumi Takahata, **Takeshi Takarada***, Masato Osawa, Eiichi Hinoi, Yukari Nakamura and Yukio Yoneda (2008) Differential regulation of cellular maturation in chondrocytes and osteoblasts by glycine. *Cell Tissue Res* 333, 91-103. *Equally contributed. 査読有

[学会発表] (計 83 件)

- [1] **宝田 剛志**, 伊藤佑真, 米田 幸雄 (2010) 神経幹細胞と PTSD 分子病態 第 83 回日本薬理学会年会 3 月 17 日 大阪国際会議場 (大阪)
- [2] **宝田 剛志**, 小西志歩, 米田 幸雄 (2010) 脳虚血応答性遺伝子 *Ifrd1* の機能解析 第 130 回日本薬学会年会 3 月 28 日 就実大学 (岡山)
- [3] **宝田 剛志**, 米田幸雄 (2010) アストロサイトに発現する *Runx2* の機能解析 第 24 回放射線同位元素研究連絡会、3 月 10 日 金沢大学 (石川)
- [4] **Takeshi Takarada**, Mika Takarada, Masaki Tachibana, Yukio Yoneda (2009) Expression of Runt Related Factor-2 by Astrocytes. 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会 11 月 13 日-15 日 国立京都国際会館 (京都)
- [5] **Takeshi Takarada** and Yukio Yoneda

(2009) Bone-related genes expressed in brain. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting, 23-28 August, BEXCO (Korea)

- [6] **宝田 剛志**, 家亦 美佳, 橘 正毅, 米田 幸雄 (2009) アストロサイトにおける Runt related factor-2 の機能的発現 第 52 回日本神経化学会大会 6 月 21 日~24 日 伊香保温泉ホテル天坊 (群馬)
- [7] Tomomi Yamamoto, **Takeshi Takarada**, Ayumi Kodama, Masaki Tachibana, Yukio Yoneda (2009) Clock Genes Expressed by Microglial Cells. 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会 11 月 13 日-15 日 国立京都国際会館 (京都)
- [8] 児玉 歩美, **宝田 剛志**, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2009) 時計遺伝子による軟骨細胞成熟過程の制御 第 116 回日本薬理学会近畿部会 11 月 13 日 ピアザ淡海 (滋賀)
- [9] Yamamoto, T., **Takarada, T.**, Kodama, A., Tachibana, M. and Yoneda, Y. (2009) Clock genes expressed in cultured microglia. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting, Busan, 23-28 August, BEXCO (Korea)
- [10] 山本 朋未, **宝田 剛志**, 米田 幸雄 (2009) ミクログリア細胞における時計遺伝子の機能的発現 第 52 回日本神経化学会大会 6 月 21 日~24 日 伊香保温泉ホテル天坊 (群馬)
- [11] 児玉 歩美, **宝田 剛志**, 佐原 甲一, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2009) 時計遺伝子 *Per1* による軟骨細胞成熟調節 日本薬学会第 129 年会 3 月 26 日~28 日 国立京都国際会館 (京都)
- [12] **宝田 剛志**, 佐原 甲一, 米田 幸雄 (2008) 軟骨細胞に発現する Indian hedgehog の時計遺伝子による調節機構 第 26 回日本骨代謝学会学術集会 10 月 29 日~31 日 大阪国際会議場 (大阪)
- [13] 山本 朋未, **宝田 剛志**, 佐原 甲一, 小椋 正人, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2008) ミクログリア細胞に発現する時計遺伝子 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会 合同年会 10 月 1 日~3 日 品川プリンスホテル (東京)
- [14] 山本 朋未, **宝田 剛志**, 佐原 甲一, 橘 正毅, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2008) ミクログリア細胞に発現する時計遺伝

子群 第51回日本神経化学学会大会 9月
11日～13日 第51回日本神経化学学会大
会（富山）

- [15] 児玉 歩美, 佐原 甲一, **宝田 剛志**, 米
田 幸雄 (2008) 軟骨細胞分化における
時計遺伝子 Period1 の役割 生体機能と
創薬シンポジウム 2008 9月5日～6日
星薬科大学 (東京)
- [16] 佐原 甲一, **宝田 剛志**, 檜井 栄一, 米
田 幸雄 (2008) 時計遺伝子による軟
骨細胞株 ATDC5 細胞の分化制御
第113回日本薬理学会近畿部会 6月20
日 ホテルグランヴィア岡山 (岡山)
- [17] 山本 朋未, **宝田 剛志**, 佐原 甲一, 小
椋 正人, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄
(2008) ミクログリア細胞における時
計遺伝子の発現 第113回日本薬理学会
近畿部会 6月20日 ホテルグランヴ
ィア岡山 (岡山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宝田 剛志 (TAKARADA TAKESHI)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 30377428

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし